

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

EJU

PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

DE 00 / 438



REC'D 02 MAY 2000	
WIPO	PCT

Bescheinigung

Die Anmelderin Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des Öffentlichen Rechts in Heidelberg, Neckar/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Fluoreszenzkorrelationsspektroskopievorrichtung und -verfahren,
insbesondere zur Mehrfachfarbenfluoreszenzkorrelations-
spektroskopie"

am 18. Februar 1999 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole G 01 J und G 01 N der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 27. März 2000

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Ebert

Aktenzeichen: 199 07 011.3



- 1 -

**Fluoreszenzkorrelationsspektroskopievorrichtung und -verfahren,
insbesondere zur Mehrfarbenfluoreszenzkorrelationsspektroskopie**

5 Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung und ein Verfahren zur Fluoreszenz-
korrelationsspektroskopie, insbesondere zur Mehrfarbenfluoreszenzkorre-
lationsspektroskopie. Hierbei werden Reaktionspartner mit Fluoreszenz-
farbstoffen markiert und in einem flüssigen, transparenten Medium frei
diffundieren gelassen. Auftretende Fluktuationen der Fluoreszenzintensität
10 können mit optischen Verfahren detektiert werden. Insbesondere bei der
Mehrfarbenfluoreszenzkorrelationsspektroskopie werden molekulare
Wechselwirkungen untersucht, indem zwei Reaktionspartner mit
unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden. Die
Reaktionspartner erzeugen bei ihrer Diffusion durch das transparente
Medium Fluktuationen der Fluoreszenzintensität. Werden überwiegend
15 korrelierte Intensitätsfluktuationen zwischen den Emissionswellenlängen der
beiden Fluorophore detektiert, so deutet dieses auf eine Komplexbildung
zwischen den beiden Partnern hin.

20 Für derartige Untersuchungen werden typischerweise kleinste
Probenmengen verwendet, da sich das untersuchbare Raumvolumen auf
einen Raumbereich in unmittelbarer Umgebung eines Fokusses, auf
welchen Lichtstrahlen in dem transparenten Medium fokussiert werden,
beschränkt.

- 2 -

Andererseits ist es notwendig, damit die Fluoreszenzkorrelations-spektroskopie mit allen ihren Vorteilen einer möglichst breiten Anwendung zugeführt werden kann, eine möglichst unkomplizierte und routinemäßige Durchführung dieses Meßverfahrens zu ermöglichen.

- 5 Es ist somit Aufgabe vorliegender Erfindung, eine gattungsgemäße Vorrichtung sowie ein gattungsgemäßes Verfahren zur Fluoreszenzkorrelations-spektroskopie, insbesondere zur Mehrfarbenfluoreszenzkorrelations-spektroskopie, bereit zu stellen, welche einerseits eine routinemäßige Durchführung von Messungen und andererseits gleichwohl ein Beherrschen kleinster Probenmengen ermöglichen.

- 15 Als Lösung schlägt die Erfindung einerseits eine gattungsgemäße Vorrichtung vor, die einen Gefäßhalter, in welchem zumindest zwei Probengefäße mit einem fokussierenden, verspiegelten Boden angeordnet sind, und eine gemeinsame Abdeckung für beide Probengefäße umfaßt, die zumindest teilweise lichtdurchlässig ist.

- 20 Eine derartige Vorrichtung läßt sich auch in kleinsten Abmessungen mit ausreichender Genauigkeit fertigen, so daß kleinste Probenvolumina innerhalb derartiger, kleiner Probengefäße für eine Messung zur Verfügung stehen. Darüber hinaus ermöglicht die Anordnung mehrerer Probengefäße in einem Gefäßhalter, daß diese ohne Weiteres gleichzeitig bzw. kurz hintereinander für eine Messung vorbereitet werden können. Auch ist es möglich, die entsprechende Meßapparatur mit einer Haltevorrichtung bzw. Transportvorrichtung für den Gefäßhalter zu versehen, so daß der Inhalt

- 3 -

der jeweiligen Probengefäße ohne weiteren Aufwand hintereinander oder sogar gleichzeitig einer Messung zugeführt werden kann. Die auf diese Weise beschriebene, erfindungsgemäße Anordnung ermöglicht somit aufgabengemäß einerseits die Verwendung kleinster Probenmengen und ermöglicht andererseits eine nahezu fließbandartige Probenpräparation bzw. Durchführung der Messung.

Durch den fokussierenden, verspiegelten Boden ist es darüber hinaus möglich, die anregenden Lichtstrahlen senkrecht in das transparente Medium einfallen zu lassen und sie erst innerhalb des Mediums zum Fokus hin abzulenken. Hierdurch können Meßfehler, die durch unterschiedliche Brechungsindizes und verschiedene Frequenzen des eingestrahlteten Lichtes bedingt sind, vermieden bzw. auf ein Minimum reduziert werden.

Vorteilhafterweise wird das Probengefäß soweit gefüllt, daß es die Abdeckung erreicht. Auf diese Weise ist gewährleistet, daß ein Lichteinfall in das Probengefäß lediglich von der Abdeckungsgeometrie und nicht von irgendwelchen Oberflächenspannungen des transparenten Mediums oder ähnlichem abhängt.

Ein konstruktiv verhältnismäßig einfacher Aufbau der Gesamtanordnung folgt, wenn die Probengefäße durch Ausformungen in dem Gefäßhalter gebildet werden. Bei einer derartigen Anordnung ist es möglich, den Gefäßhalter einstückig auszubilden und mit jedem geeigneten Verfahren Vertiefungen in denselben einzubringen, die als Probengefäße dienen.

Hierbei ist lediglich der Boden dieser Ausformungen in erfindungsgemäßer Weise fokussierend auszubilden.

5 Der Boden kann hierbei parabolisch oder auch elliptisch geformt sein. Ebenso ist in bestimmten Grenzen ein halbkugelschalenförmiger Boden denkbar.

Um eine langfristige Haltbarkeit der Verspiegelung zu gewährleisten, kann der Boden mit einer gegenüber üblichen Pufferlösungen resistenten Schicht verspiegelt werden.

10 Hierbei sollte der Fokus des Probengefäßes derart gewählt sein, daß er innerhalb des Probengefäßes liegt. Bei einer derartigen Anordnung kann auf komplexe Optiken, die das einfallende Licht vorab in geeigneter Weise ablenken, verzichtet werden, wodurch insbesondere auch die Gefahr von Meßfehlern durch unterschiedliche Brechungswinkel reduziert wird.

15 An jedem Probengefäß kann ein Druckausgleich vorgesehen sein. Ein derartiger Druckausgleich ermöglicht es, einerseits jedes Probengefäß in beliebiger Weise zu füllen oder zu entleeren und/oder andererseits zu gewährleisten, daß Baugruppen, wie eine Abdeckung bzw. ein in der Abdeckung vorgesehenes Lichtfenster in die in dem Probengefäß erhaltene Flüssigkeit eintauchen bzw. vollständig von dieser benetzt werden können.

20 Wie bereits vorstehend erläutert, ermöglicht diese Benetzung bzw. dieses Eintauchen, daß die Oberflächenrichtung der Flüssigkeit nicht zufällig sondern durch die Oberfläche der Abdeckung bzw. die Oberfläche eines

Lichtfensters bestimmt wird. Es versteht sich, daß ein derartiger Druckausgleich auch unabhängig von den übrigen Merkmalen der erfindungsgemäßen Vorrichtung vorteilhaft für eine Vorrichtung zur Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie Anwendung finden kann.

- 5 In vorliegendem Zusammenhang wird unter dem Begriff "Lichtfenster" eine Baugruppe bzw. ein Bereich der Abdeckung verstanden, durch welchen Licht zur Fluoreszenzanregung durch die Abdeckung hindurch in ein jeweiliges Probengefäß gestrahlt wird.

- 10 Beispielsweise kann die Abdeckung als planparallele Platte ausgebildet sein, die auf dem Gefäßhalter plan aufliegt und die Probengefäße abdeckt. Hierbei besteht jedoch in der Regel die Schwierigkeit, die darunterliegenden Gefäße zumindest derart vollständig mit dem flüssigen Medium zu füllen, daß wenigstens die jeweiligen Lichtfenster benetzt sind. Durch geeignete Maßnahmen, wie Abdichtungen, genaue Dosierungen und
- 15 Beherrschung der Adhäsions- und Kohäsionskräfte lassen sich diesbezüglich Wege finden.

- 20 Diese Probleme lassen sich vermeiden, wenn an der Abdeckung ein Stempel vorgesehen ist, der jeweils in ein Probengefäß hineinragt. Durch den Spalt zwischen Stempel und Probengefäßwand kann nunmehr ein Druckausgleich stattfinden, so daß das Probengefäß nicht mehr mit allerhöchster Genauigkeit befüllt werden muß. Etwaige Luft bzw. zuviel vorhandenes transparentes Medium können an den Seiten abgeführt werden. Insbesondere kann durch einfache Maßnahmen, wie beispielsweise

- 6 -

kleine Kanäle oder Ablauflöcher, vermieden werden, daß transparentes Medium in benachbarte Probengefäße gelangt.

Vorteilhafterweise sind die Lichtfenster der Abdeckung jeweils in den Stempeln vorgesehen.

- 5 Die Stempel können einerseits einstückig mit der Abdeckung ausgestaltet sein. Andererseits ist es möglich, daß die Stempel durch Enden von Lichtleitfasern gebildet werden, die mit der Abdeckung verbunden sind und durch diese hindurch in die Probengefäße hineinragen.

- 10 Vorteilhafterweise ist der Stempel derart dimensioniert, daß zwischen ihm und dem Probengefäß ein um den Stempel unlaufender Spalt verbleibt. Dieser Spalt wird ausreichend groß gewählt, so daß kein transparentes Medium aus dem Probengefäß herausströmt, wenn der Stempel in das Probengefäß eintaucht und seine Meßposition erreicht. Der durch diesen Spalt gebildete Raum dient somit als Puffer, der verschiedene Füllmengen, insbesondere im Rahmen einer Meßgenauigkeit, ausgleichen kann.
- 15

- 20 Es versteht sich, daß ein derartiger, in ein Probengefäß eintauchender Stempel auch unabhängig von den übrigen Merkmalen bei einem einzelnen Probengefäß für eine Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie vorteilhaft Verwendung finden kann. Insbesondere braucht dann das Probengefäß nicht mit einem genau bemessenem Füllvolumen befüllt zu werden. Dieses ist insbesondere bei kleinen Probenmengen von großem Vorteil, da bei diesen um so schwerer genaue Volumina abgemessen werden können. Insofern

ermöglicht ein derartiger Stempel auch unabhängig von den übrigen Merkmalen, daß bei kleinsten Probenmengen mit verhältnismäßig großen Toleranzen und somit unter verhältnismäßig unkomplizierten und schnell ausführbaren Bedingungen Messungen durchgeführt werden können.

- 5 Auch schlägt die Erfindung ein Verfahren zur Fluoreszenzkorrelations-spektroskopie, insbesondere zur Mehrfarbenfluoreszenzkorrelations-spektroskopie, vor, bei dem Lichtstrahlen in einem transparenten Medium fokussiert werden, welches sich in einem Probengefäß befindet. Hierbei wird in das Probengefäß, welches einen fokussierenden Boden aufweist, ein Stempel mit einem dem Boden zugewandten Lichtfenster eingeführt und die Menge des transparenten Medium derart gewählt, daß das Lichtfenster des Stempels von dem Medium benetzt wird.

- 15 Vorteilhafterweise wird der Stempel lediglich bis oberhalb des Fokusscs in das Probengefäß eingeführt, so daß durch das Lichtfenster einfallendes Licht durch den Boden in den Fokus fokussiert werden kann und dort, in dem transparenten Medium, eine gewünschte Messung initiiert.

Das Verfahren gestaltet sich besonders einfach, wenn der Stempel in das transparente Medium eintaucht. Auf diese Weise ist in jedem Falle eine ausreichende Benetzung gewährleistet.

- 20 Weist der Stempel einen zur optischen Achse des fokussierenden Probengefäßbodens senkrechten Oberflächenbereich auf, so wird auf einfache, konstruktive Weise gewährleistet, daß durch den Stempel

einfallendes Licht nicht unnötigerweise gebrochen wird. Hierdurch lassen sich Fehler, die durch Licht verschiedener Frequenzen bedingt sind, vermeiden.

5 Es versteht sich, daß die im vorliegenden Zusammenhang angesprochenen geometrischen Verhältnisse, wie "senkrecht", "eliptisch" bzw. "parabolisch" und ähnliches, lediglich im Rahmen der für die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie gewünschten Meßgenauigkeiten exakt gewählt werden brauchen. Insbesondere der Boden sollte auf einen Bruchteil der verwendeten Wellenlängen genau gefertigt sein. Auch die Abweichungen der Abdeckung, des Stempels bzw. der geometrischen Lage des Lichtfensters sind entsprechend der verwendeten Wellenlängen größer oder kleiner zu wählen.

15 Es ist darüber hinaus möglich, in der Wandung des Probengefäßes eine Öffnung vorzusehen, die in eine Zuführleitung und/oder eine Abführleitung für das transparente Medium mündet. Derartige Leitungen können beispielsweise durch einfache Bohrungen in dem Gefäßhalter gewährleistet sein. Ebenso könnten an der Gefäßhalteroberfläche unmittelbar unter der Abdeckung Nuten vorgesehen werden, die, wenn durch die Abdeckung abgedeckt, derartige Kanäle bilden. Derartige schlichte Öffnungen bzw. 20 derartige Kanäle können auch in kleinsten Geometrien ohne Weiteres mit bereits bekannten technischen Verfahren in einem Gefäßhalter bereitgestellt werden. Derartige Leitungen können einerseits einem Druckausgleich und andererseits einer Zufuhr bzw. Abfuhr des transparenten Mediums oder

- 9 -

aber auch anderer Substanzen, wie Meßsubstanzen oder Reinigungssubstanzen, dienen.

5 Da bei derartigen, schlichten Öffnungen auf jegliche konstruktive Feinheiten, wie kapilarartigen Zuführungen bis in den Fokus hinein und ähnliches, verzichtet wird, sind derartige Anordnungen auch bei kleinsten Probengefäßgrößen realisierbar. Auch diese fördern eine schnelle und serielle Durchführung der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie, wobei es sich versteht, daß derartige Öffnungen auch unabhängig von der Zahl der verwendeten Probengefäße und dem Vorhandensein einer Abdeckung vorteilhaft Verwendung finden können.

Weitere Vorteile, Ziele und Eigenschaften vorliegender Erfindung werden anhand der Beschreibung anliegender Zeichnung erläutert, in welcher beispielhaft zwei erfindungsgemäße Vorrichtungen zur Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie dargestellt sind. In der Zeichnung zeigen:

- 15 Figur 1 einen schematischen Schnitt durch eine erste erfindungsgemäße Vorrichtung und
- Figur 2 einen schematischen Schnitt durch eine zweite erfindungsgemäße Vorrichtung.

20 Die in Figur 1 dargestellte erste Ausführungsform der Erfindung weist einen Gefäßhalter 1 auf, in welchen Ausformungen als Probengefäße 2 (exemplarisch beziffert) eingebracht sind. Darüber hinaus umfaßt diese Ausführungsform eine Abdeckung 3 mit durchsichtigen Stempeln 4

- 10 -

(exemplarisch beziffert), die in abgedecktem Zustand in die Probengefäße 2 hineinragen.

5 Auf der gegenüberliegenden Seite der Abdeckung 3 sind Lichtleiter 5 (exemplarisch beziffert) vorgesehen, durch welche Licht durch die Stempel 4 hindurch in die Probengefäße 2 und aus diesen herausgeleitet werden kann. Es versteht sich, daß die Lichtleiter 5 auch statt der Stempel 4 vorgesehen sein können und durch die Abdeckung 3 hindurch in die Probengefäße 2 hineinragen können.

10 Der Boden 6 (exemplarisch beziffert) eines jeden Probengefäßes ist fokussierend ausgeformt und an seiner Innenseite mit einer gegenüber üblichen Pufferlösungen resistenten Schicht verspiegelt.

15 Zum Betrieb dieser Vorrichtung werden die Probengefäße 2 nach Bedarf mit einem transparenten Medium befüllt. Dieses geschieht soweit, daß nach Aufsetzen der Abdeckung 3 die Stempel 4 jeweils in das transparente Medium eintauchen. Insofern dient der zwischen Probengefaß 2 und Stempel 4 vorhandene Spalt 7 (exemplarisch beziffert) als Druckausgleich und als Zwischenspeicher für zuviel eingefülltes transparentes Medium.

20 Dadurch daß die Unterseite der Stempel 7 einen zur optischen Achse des fokussierenden Probengefaßbodens 6 senkrechten Oberflächenbereich aufweist und daß Licht aus dem Lichtleiter 5 annähernd senkrecht durch ein in diesem Oberflächenbereich befindliches Lichtfenster in das Probengefaß 2 gelangt, braucht die Abdeckung 3 nicht sehr genau

- 11 -

bezüglich der Probengefäße 2 positioniert werden. Leichte seitliche Abweichungen spielen wegen des parallelen Lichteinfalls und des entsprechend fokussierend gewählten Bodens 6 keine Rolle.

5 Bei der in Figur 2 dargestellten Ausführungsform sind in einem Gefäßhalter 1 Probengefäße 2 (exemplarisch beziffert) mit fokussierenden, verspiegelten Böden 6 (exemplarisch beziffert) vorgesehen. Auf dem Gefäßhalter 1 liegt eine Abdeckung 3 mit einer planen Unterseite auf, in welche den Probengefäßen 2 entsprechend Lichtleiter 5 (exemplarisch beziffert) eingebracht sind. Darüber hinaus sind in jeder Probengefäßwand Öffnungen 8 (exemplarisch beziffert) vorgesehen, die in Zufuhr- bzw. Abfuhrleitungen 9 (exemplarisch beziffert) münden. Diese dienen einerseits als Druckausgleich bzw. Überlauf und verhindern auf diese Weise, daß bei Auflegen der Abdeckung 3 transparentes Medium über die Probengefäßwandung hinaus in andere Probengefäße 2 gelangt. Bei aufgelegter 15 Abdeckung 3 können diese Leitungen 9 darüber hinaus dafür genutzt werden, Probenflüssigkeit auszutauschen bzw. die Probengefäße 2 zu spülen.

Die Leitungen 9 können einerseits durch Bohrungen (wie dargestellt) bereitgestellt werden. Andererseits können in der Oberseite des Gefäßhalters 1 Nuten oder andere Ausnehmungen vorgesehen sein, die gemeinsam mit der Abdeckung 3 die Leitungen 9 bilden. Es ist denkbar, eine der Öffnungen 8 im Bodenbereich des Probengefäßes 2 vorzusehen.

- 12 -

Die Durchmesser der Öffnungen 8 und der Leitungen 9 sowie deren Lage sind derart gewählt, daß ein vollständiges Befüllen der Probengefäße möglich ist. Wie aus Figur 2 unmittelbar ersichtlich, ist es auch möglich, die Lichtleiter 5 durch die Abdeckung 3 bis in die Probengefäße 2 hindurchzuführen. Dann ist ein vollständiges Befüllen der Probengefäße 2 nicht mehr notwendig.

- 13 -

Patentansprüche:

- 5
1. Vorrichtung zur Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie, insbesondere zur Mehrfarbenfluoreszenzkorrelationsspektroskopie, bei der Lichtstrahlen in einem transparenten Medium fokussiert werden, welches sich in einem Probengefäß (2) befindet, *gekennzeichnet durch* einen Gefäßhalter (1), in welchem zumindest zwei Probengefäße (2) mit einem fokussierenden, verspiegelten Boden (6) angeordnet sind, und eine gemeinsame Abdeckung (3) für beide Probengefäße (2), die zumindest teilweise lichtdurchlässig ist.
- 10
2. Vorrichtung nach Anspruch 1, *dadurch gekennzeichnet, daß* die Probengefäße (2) durch Ausformungen in dem Gefäßhalter (1) gebildet sind.
3. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2, *dadurch gekennzeichnet, daß* der Fokus innerhalb der Probengefäße (2) liegt.
- 15
4. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, *dadurch gekennzeichnet, daß* jedes Probengefäß (2) eine Druckausgleich aufweist.
- 20
5. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, *dadurch gekennzeichnet, daß* die Abdeckung (3) zumindest zwei Stempel (4) aufweist, die jeweils in ein Probengefäß (2) hineinragen.

6. Vorrichtung nach Anspruch 5, *dadurch gekennzeichnet, daß* zumindestens ein Stempel (4) derart dimensioniert ist, daß zwischen dem Stempel (4) und dem Probengefäß (2) ein um den Stempel (4) umlaufender Spalt (7) verbleibt.
- 5 7. Vorrichtung nach Anspruch 5 oder 6, *dadurch gekennzeichnet, daß* zumindest ein Stempel (4) einen zur optischen Achse des fokussierenden Probengefäßbodens (6) senkrechten Oberflächenbereich aufweist.
- 10 8. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, *dadurch gekennzeichnet, daß* in der Wandung des Probengefäßes (2) eine Öffnung (8) vorgesehen ist, die in eine Zufuhr- und/oder Abfuhrleitung für das transparente Medium mündet.
- 15 9. Verfahren zur Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie, insbesondere zur Mehrfarbenfluoreszenzkorrelationsspektroskopie, bei dem Lichtstrahlen in einem transparenten Medium fokussiert werden, welches sich in einem Probengefäß (2) befindet, *dadurch gekennzeichnet, daß* in das Probengefäß (2), welches einen fokussierenden Boden (6) aufweist, ein Stempel (4) mit einem dem Boden (6) zugewandten Lichtfenster eingeführt und die Menge des transparenten Mediums derart gewählt wird, daß das Lichtfenster des Stempels (4) von dem Medium benetzt wird.
- 20

103789

- 15 -

10. Verfahren nach Anspruch 9, *dadurch gekennzeichnet, daß* der Stempel (4) bis oberhalb des Fokusses des Bodens (6) eingeführt wird.

11. Verfahren nach Anspruch 9 oder 10, *dadurch gekennzeichnet, daß* der Stempel (4) in das transparente Medium eintaucht.

5

18.02.99

Abstrakt (Figur 1)

Eine Vorrichtung zur Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie, insbesondere zur Mehrfarbenfluoreszenzkorrelationsspektroskopie, bei der Lichtstrahlen in einem transparenten Medium fokussiert werden, welches sich in einem Probengefäß (2) befindet, umfaßt einen Gefäßhalter (1), in welchem zumindest zwei Probengefäße (2) mit einem fokussierenden, verspiegelten Boden (6) angeordnet sind, und eine gemeinsame Abdeckung (3) für beide Probengefäße (2), die zumindest teilweise lichtdurchlässig ist.

Bei einem entsprechenden Verfahren wird in das Probengefäß (2) ein Stempel (4) mit einem dem Boden (6) zugewandten Lichtfenster eingeführt und die Menge des transparenten Mediums derart gewählt, daß das Lichtfenster des Stempels (4) von dem Medium benetzt wird.

13.02.99

Fig. 1

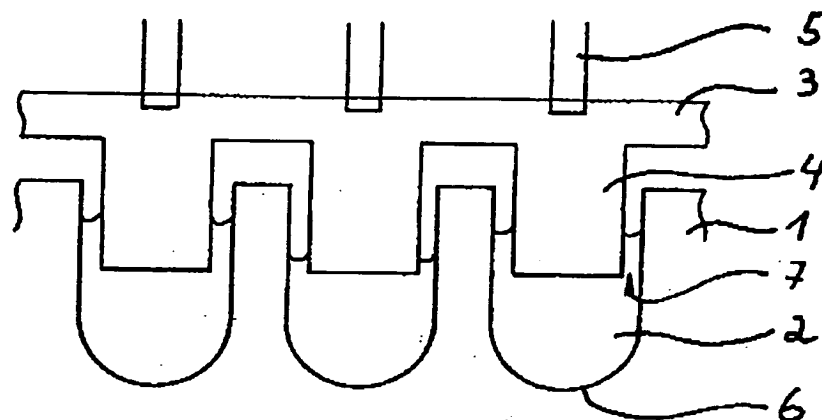


Fig. 2

